

# Caracterización microbiológica del pulque y cuantificación de su contenido de etanol mediante espectroscopia Raman

M. Cervantes-Contreras.

Departamento de Matemáticas, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología-Instituto Politécnico Nacional, Ticoman, México D. F. 07340, México

Pedroza A. M

Laboratorio de Biotecnología Aplicada. Departamento de Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana Bogotá. Colombia. Carrera 7 No 43-82

(Recibido: 15 de diciembre de 2007; Aceptado: 9 de febrero de 2008)

En este trabajo se llevo a cabo un estudio microbiológico del *pulque*, una bebida tradicional alcohólica mexicana, para cuatro diferentes tiempos de fermentación. Estudiamos las diferentes poblaciones de *Saccharomyces* sp, *Zymomonas* sp y *Leuconostoc* sp y evaluamos las diferentes concentraciones de azúcares, proteínas y etanol. Se presenta un método de análisis simple y exacto para la determinación del contenido de alcohol en el pulque, basado en espectroscopia Raman.

*Palabras claves:* *Saccharomyces* sp; *Zymomonas* sp; *Leuconostoc* sp; Raman; Etanol

In this work a microbiological study of *pulque*, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, was carried from four different times of fermentation. We studied the different populations of *Saccharomyces* sp, *Zymomonas* sp and *Leuconostoc* sp and we evaluated the different concentrations of sugar, proteins and ethanol. A simple, accurate and quantitative analysis method based on Raman spectroscopy, for determination of different level of ethanol content in *pulque* has been developed.

*Keywords:* *Saccharomyces* sp; *Zymomonas* sp; *Leuconostoc* sp; Raman; Ethanol

## 1. Introducción.

El *pulque* es una bebida tradicional mexicana que se obtiene por la fermentación de la savia azucarada conocida como *aguamiel*. Esta bebida es consumida por poblaciones indígenas y mestizas de muchas regiones del país, particularmente en las áreas de la meseta central. Es una bebida alcohólica, blanca y espesa, del altiplano de México, que se obtiene haciendo fermentar el *aguamiel* o jugo extraído de diferentes especies de maguey (*Agave americana*, *A. atrovirens*, *A. ferox*, *A. mapisaga*, *A. salmiana*) [1].

El proceso de fermentación inicia en el maguey, donde se encuentran microorganismos autóctonos como levaduras, bacterias lácticas, bacterias etanólicas y bacterias productoras de exopolisacaridos [2]. Estos microorganismos fermentan parte de los azúcares disponibles en el agua miel, sin embargo el proceso se acelera por la adición de un inóculo más fermentado que es llamado *semilla* (una porción de pulque previamente producido). El tiempo de fermentación puede durar de 12 a 48 horas, si se tienen condiciones de temperatura adecuada y en los recipientes no esta ninguna sustancia que tenga un efecto inhibitorio. A medida que pasa el tiempo se presentan cambios importantes como un incremento en el porcentaje de alcohol y formación de exopolisacaridos [3].

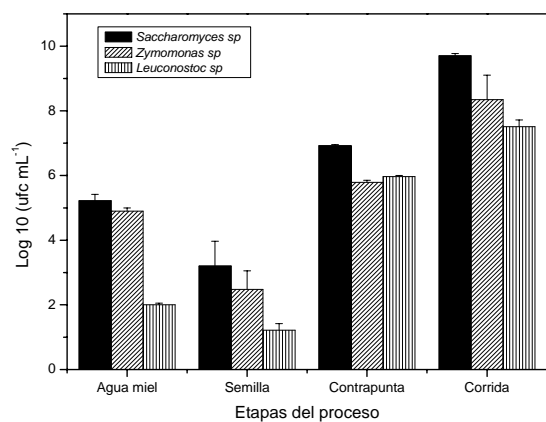
Los consorcios microbianos son frecuentemente encontrados en varias bebidas fermentadas y se considera que esta interacción positiva es un mecanismo evolutivo que favorece a todas las poblaciones presentes en el consorcio con respecto a la captación de nutrientes y

eliminación de ciertos metabolitos que pueden llegar a ser tóxicos si se acumulan en la bebida fermentada. En 1912 se aisló por primera vez una bacteria productora de etanol, que fue catalogada posteriormente como *Zymomonas mobilis*. Inicialmente se postulaba que el mecanismo de utilización de glucosa y fructosa en *Zymomonas*, era igual al de las levaduras. Sin embargo en realidad *Zymomonas* no utiliza la vía glicolítica, sino la de Entner-Doudoroff y de acuerdo al balance energético de esta vía sólo se produce un mol de ATP por mol de glucosa utilizado.

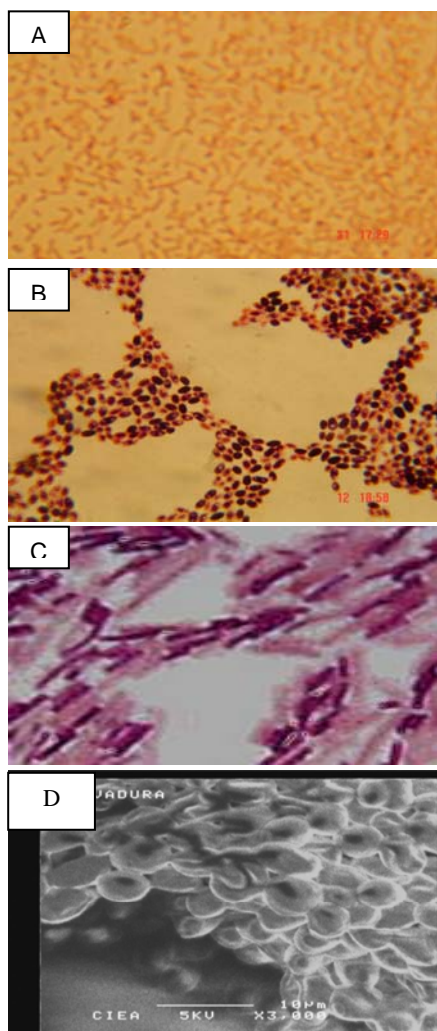
Las levaduras que se pueden aislar del pulque pueden ser del género *Saccharomyces* sp su nombre significa saccharo: azúcar y myces: hongo. Se encuentra naturalmente en uvas, frutos, melazas, mieles y aguas azucaradas. Tiene un metabolismo aeróbico y anaeróbico. El alcohol es producido por vía anaeróbica (Glicólisis anaeróbica) se produce etanol, CO<sub>2</sub> y células como producto de la fermentación.

El contenido de etanol es muy importante en las bebidas alcohólicas. Principalmente, el conocimiento del porcentaje de etanol sirve como un índice de calidad en estas bebidas. Actualmente, se pueden obtener estos porcentajes mediante un método sencillo, realizando un análisis cuantitativo a partir de los resultados obtenidos mediante espectroscopia de dispersión Raman.

En el presente artículo se realizó un estudio microbiológico para evaluar el comportamiento de las poblaciones microbianas presentes en el pulque y su efecto sobre los compuestos mayoritarios como carbono y nitrógeno. Se desarrollo un método para determinar la concentración alcohólica en cuatro diferentes etapas de



**Figura 1.** Recuento de poblaciones recuperadas en cada etapa del proceso de elaboración del pulque. Siembra por microgrota en agar papa dextrosa acidificado (*Sacharomyces sp*), Agar LW (*Zymomonas sp*) y MRS (*Leuconostoc sp*). Incubación por tres y cinco días a 25 °C. Promedio de tres repeticiones.



**Figura 2.** Características microscópicas con coloración de Gram. Aumento de 100 X (A) *Zymomonas sp*, (B) *Saccharomyces sp*, (C) *Leuconostoc sp*. (D) Imagen SEM donde se observan las células levaduriformes (*Saccharomyces sp*) Para la muestra denominada *corrida*, preparada en fresco sin recubrimiento con oro, con un aumento de 3000 X, y un voltaje de 5 kV.

fermentación, mediante un análisis de los espectros de dispersión Raman.

## 2. Materiales y metodos

### 2.1 Sitio de origen del pulque y muestreo

Las muestras de pulque se obtuvieron en el estado de Tlaxcala, México, en el pueblo de San Simón Tlatlahuquitepec, perteneciente al municipio de San Martín Xaltocan (19°25'N, 98°40'W), encontrándose a una altitud de 2,492 m.

Los muestreos se realizaron en frascos shott tapa rosca de 200 mL tomando 50 mL de material líquido correspondiente a cada una de las etapas del proceso e identificadas como: Aguamiel, semilla, *contrapunta* y *corrida*. El aguamiel corresponde al líquido extraído de la cepa del maguey. La semilla es un pulque con fermentación de alrededor de 60 días. La *contrapunta* es un pulque de 24 horas de fermentación obtenido por una mezcla 1:1 de aguamiel y semilla. La *corrida* corresponde a un pulque de 48 horas de fermentación, esta es la etapa final y se comercializa en la zona. Las muestras se transportaron refrigeradas y se procesaron durante las 24 horas siguientes.

### 2.2 Aislamiento primario

Cada una de las muestras pertenecientes a las diferentes etapas del proceso fueron procesadas para obtener diluciones seriadas ( $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$ ) empleando agua peptonada al 0.1 % (p/v). La siembra se realizó con la micro técnica reportada por Doyle M. [4]. Se tomaron 20  $\mu$ L de cada dilución y se sembraron sobre medios para levaduras (Agar YPG suplementado con antibióticos para inhibir bacterias), *Zymomonas sp* (Agar LW) y *Leuconostoc* (Agar MRS suplementado con 20 % (p/v) de sacarosa y 0.001 % (p/v) de púrpura de bromocresol). Las cajas se incubaron por 72 horas para bacterias y 5 días para hongos. Posteriormente se realizó el recuento de colonias expresado como UFC mL<sup>-1</sup> y se seleccionaron las más representativas de los tres grupos. La purificación de colonias se llevó a cabo por medio de pases sucesivos en medios específicos [5]. La morfología microscópica se visualizó por medio coloración de Gram siguiendo la metodología descrita por Meza et al. [6]. La confirmación de género se realizó empleando pruebas bioquímicas de acuerdo a la referencia [6]. Las imágenes se obtuvieron mediante un microscopio óptico con un aumento de 100 X.

### 2.3 Microscopia electrónica de barrido

El consorcio microbiano fue observado por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM) empleando un microscopio de la marca JEOL JSM-6300, que proporciona ampliaciones de hasta 300 000 X. Las muestras fueron observadas directamente sin hacer recubrimiento con oro, obteniéndose imágenes de 3000 X, con un voltaje de 5 kV.

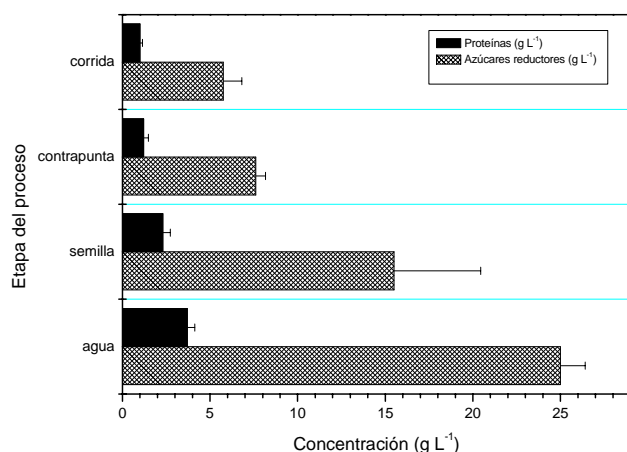


Figura 3. Concentración de proteínas y azúcares reductores durante cada etapa del proceso de fermentación artesanal de pulque.

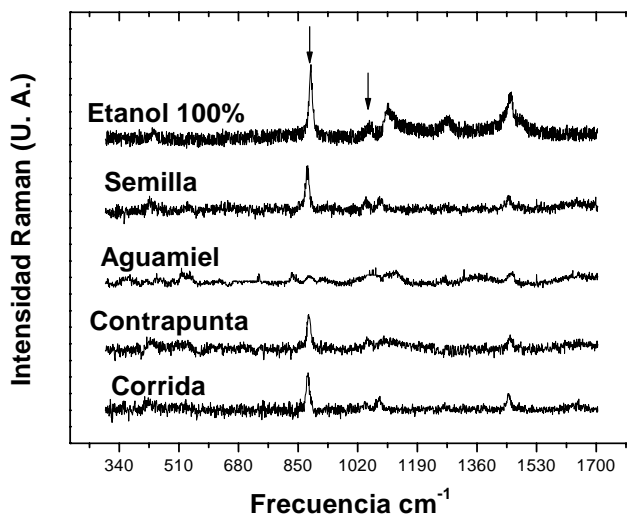


Figura 4. Espectros Raman de las cuatro muestras estudiadas junto con el espectro obtenido para la muestra con un 100% de etanol.

#### 2.4 Cuantificación de azúcares reductores totales.

La cuantificación de azúcares reductores totales se realizó por medio de la técnica colorimétrica de oxidoreducción del ácido 3,5- dinitrosalicílico, empleando glucosa anhidra como patrón estándar. Las muestras se centrifugaron 20 minutos a 5000 rpm y se tomó el sobrenadante para la cuantificación. Los resultados están expresados como g L<sup>-1</sup> de azúcares reductores totales [7]. Los resultados presentados corresponden al promedio de tres repeticiones con una desviación estándar.

#### 2.5 Cuantificación de proteínas totales

Se realizó por la técnica colorimétrica de azul de comassie G-250 reportada por Bradford [8]. Como estándar se utilizó albúmina de suero bovino (BSA)

#### 2.6 Cuantificación de etanol

La cuantificación de etanol se realizó por medio de cromatografía de gases de acuerdo a la técnica reportada por Rios E y Calva, 1999 [9]. Las muestras fueron centrifugadas por 15 minutos a 5000 rpm, se recuperó el sobrenadante y se inyectó en el cromatógrafo.

Los valores de porcentaje fueron calculados empleando una curva de calibración de etanol previamente estandarizada.

#### 2.7 Espectroscopia Raman

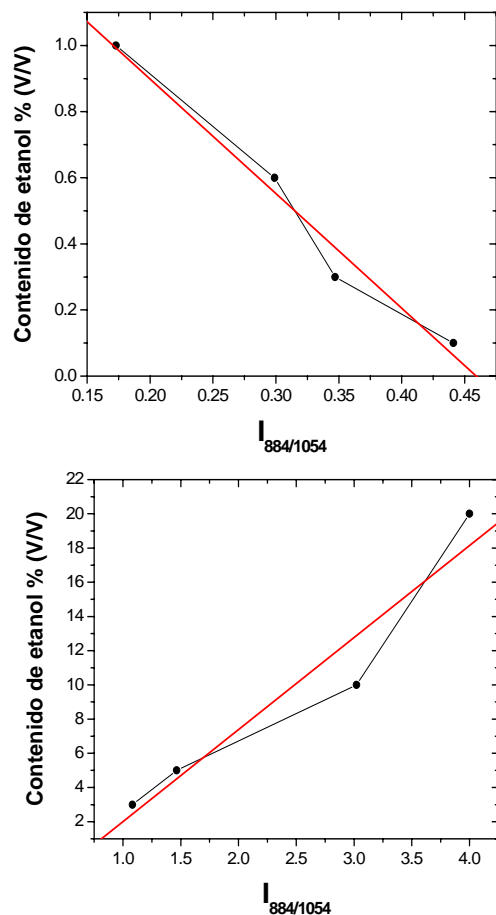
Un conjunto de muestras de solución agua/etanol con diferentes porcentajes de etanol fueron preparadas para construir un modelo de referencia, obteniéndose una curva de calibración, la cual se empleó para calcular los porcentajes de etanol en las muestras del *pulque*. Usamos etanol de 99.9% de pureza y agua bidestilada. Las muestras fueron preparadas obteniéndose mezclas con porcentajes de 0.1 % a 20 % y 100 % de etanol.

Los espectros Raman se obtuvieron mediante una geometría de retrodispersión en un sistema micro Raman LABRAM, el cual es un sistema Raman integrado. Tiene un microscopio acoplado para el espectrógrafo con una longitud focal de 300 mm. Tiene un láser interno de HeNe de 20 mW montado en la parte de atrás del instrumento, el cual es utilizado para excitar la muestra. Se utilizó un objetivo de 50 X y la señal fue analizada con un detector CCD. Los espectros Raman de agua/etanol y del pulque se obtuvieron en un rango de 300 cm<sup>-1</sup> a 1700 cm<sup>-1</sup> a temperatura ambiente, incidiendo el láser sobre un volumen de 2 ml.

### 3. Resultados y discusión

#### 3.1 Aislamiento primario.

Mediante la técnica de dilución decimal y siembra sobre medios de cultivo agarizados, se puede estimar la población microbiana presente en una muestra desconocida a partir de la capacidad que tienen los microorganismos para utilizar los componentes del medio de cultivo y crecer formando unidades independientes denominadas colonias. Cada una de ellas tendrá características morfológicas específicas para cada género. De acuerdo al recuento de poblaciones, se puede observar que existe un consorcio entre levaduras y bacterias. Ver figura 1. Estos grupos estuvieron presentes en todas las etapas del proceso sin embargo se presentó variación con respecto a la cantidad. En el aguamiel y la semilla se obtuvieron los recuentos más bajos. Este resultado puede estar asociado con las características iniciales del aguamiel que es líquido fresco no fermentado rico en azúcares fermentables y proteínas que mantiene unas poblaciones autóctonas en espera de unas condiciones ambientales y nutricionales apropiadas para su propagación. Con respecto a la semilla se encontraron recuentos más bajos posiblemente por que este



**Figura 5.** Curvas de calibración de las mezclas agua/etanol para concentraciones entre 0.1 y 1 % (a) y entre 3 y 20% (b).

producto llevaba alrededor de 60 días de fermentación, tiempo en el cual las poblaciones han consumido la mayoría de la fuente de carbono y nitrógeno, determinando que pudieran entrar en un crecimiento estacionario ó por el contrario se presentara la muerte celular por déficit de nutrientes [10]. En la etapa llamada *contrapunta* en la cual se mezcla en proporción 1:1 el agua miel y semilla, los recuentos de levaduras y bacterias incrementaron, la respuesta positiva en las poblaciones pudo estar asociada a dos posibles factores. La primera fue la adición de sustrato fresco rico en carbohidratos y proteínas a partir del cual las células pueden obtener carbono y energía. La segunda hace referencia al aporte de aminoácidos, vitaminas y cofactores esenciales aportados por la *semilla*. Es factible que tras 60 días de fermentación muchas células se lisaron y dejaron libre en el pulque estos componentes esenciales que fueron tomados por las nuevas poblaciones. Adicionalmente la *contrapunta* llevaba 24 horas de fermentación.

Esta combinación de factores se comprobó al analizar los resultados en la muestra identificada como *corrida* que corresponden a un pulque de 48 horas de fermentación. En

esta etapa se observó un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) en todos los grupos. La posible explicación es el consumo de sustrato, formación de células y formación de producto (etanol). Un resultado interesante fue el incremento de *Leuconostoc* sp; este incremento se podría correlacionar con el aumento en la viscosidad, cambio físico típico en un pulque maduro.

Con respecto a las morfologías microscópicas, las colonias para cada género presentaron tres formas características, unas de color blanco, cremosas, grandes y de borde regular asociadas con levaduras, el segundo grupo recuperado se desarrolló formando colonias pequeñas, puntiformes translúcidas que se podrían asociar con *Zymomonas* sp. El último grupo se caracterizó por crecer en colonias grandes mucoides semitransparentes características de *Leuconostoc* sp. Los datos experimentales concuerdan con el trabajo realizado por Escalante. [2]. En su investigación identificaron por técnicas moleculares *Leuconostoc pseudomesenteroides*, diferentes géneros de *Lactobacillus* *Hafina alvei*. A diferencia de ellos en este estudio se recuperó *Zymomonas* sp

En la figura 2 (A), (B) y (C) se observa el análisis microscópico por medio de la coloración de Gram el cual permitió observar las morfologías típicas de *Zymomonas* sp (Cocobacilos Gram negativos), *Sacharomyces* sp (Hongo levaduriforme), y *Leuconostoc* sp (Bacilos Gram positivos), respectivamente. En la figura 2 (D) se observa la imagen obtenida por SEM de células levaduriformes. Por SEM solamente se pudo observar las células levaduriformes (*sacharomyces* sp). Un recubrimiento con oro puede hacer visibles los tres grupos morfológicos.

### 3.2 Cuantificación de azúcares reductores totales, proteínas y etanol.

Empleando las técnicas colorimétricas de Millar [7] y Bradford [8] se pudo estimar la concentración de  $\text{g L}^{-1}$  de azúcares reductores totales y proteínas; ver figura 3. Encontrando que al inicio del proceso (aguamiel) se presentó la mayor cantidad de azúcares y proteínas a razón de  $25 \text{ g L}^{-1}$  y  $3.7 \text{ g L}^{-1}$  lo que demuestra que el aguamiel es un sustrato rico que favorece el crecimiento de poblaciones microbianas que utilizan los compuestos del *aguamiel* como fuente de carbono y energía. De acuerdo a la bibliografía [2], en el pulque se dan tres tipos de fermentación, ácida, alcohólica y viscosa. La interacción de las tres determina que se presente un incremento en los recuentos poblacionales, consumo de azúcares, proteínas, formación de etanol y algunos exopolisacáridos que le dan aspecto viscoso. De acuerdo a los grupos recuperados, las rutas metabólicas que se podrían estar llevando a cabo son glicólisis y Entner-Doudoroff. *Sacharomyces* sp y *Leuconostoc* sp podrían usar la glucólisis para la obtención de energía a partir de glucosa y sacarosa, con la producción final de etanol. Por el contrario *Zymomonas* sp emplearía la ruta de Entner Doudoroff a partir de la cual también se obtiene etanol.

**Tabla 1.** Concentraciones de etanol par alas cuatro diferentes etapas de fermentación., obtenidas mediante espectroscopia de gases <sup>a</sup> y a través de los espectros de espectroscopia Raman <sup>b</sup>.

Muestra	Contenido de etanol	
	% (V/V)	
<i>Aguamiel</i>	0.26 <sup>a</sup>	0.39 <sup>b</sup>
<i>Semilla</i>	7.01 <sup>a</sup>	7.03 <sup>b</sup>
<i>Contrapunta</i>	6.34 <sup>a</sup>	6.25 <sup>b</sup>
<i>Corrida</i>	10.35 <sup>a</sup>	9.09 <sup>b</sup>

Como se observa en la figura 3, el contenido de azúcar y proteína va disminuyendo en función del tiempo de fermentación, sin embargo no llega a ser consumido en su totalidad es por esto que el pulque al final del proceso ó etapa denominada como corrida tiene un ligero sabor dulce, contenido de proteína y etanol. En un pulque de 48 horas de fermentación el contenido de etanol fue de 10.35 %, 4.76 g L<sup>-1</sup> de azúcares reductores y 1 g L<sup>-1</sup> de proteína. Los porcentajes de etanol obtenidos mediante cromatografía de gases se muestran en la tabla 1.

### 3.3 Concentraciones de etanol obtenidas mediante espectroscopia Raman.

En la figura 4 se muestran los espectros Raman de las cuatro muestras estudiadas junto con el espectro obtenido para la muestra con un 100% de etanol. En esta figura podemos observar varios picos, en particular los indicados con flechas en la figura 4 localizados alrededor de 884 cm<sup>-1</sup> (symmetric CCO stretching [11]) y 1054 cm<sup>-1</sup>; este ultimo lo usamos para normalizar. Estos dos picos se observaron en todos los espectros Raman del pulque y de las mezclas agua/etanol, incluyendo el de etanol 100 %. La cuantificación de los porcentajes de etanol se realizó calculando el área bajo la curva en estos dos picos, obteniéndose la razón del área bajo el pico localizado en 884 cm<sup>-1</sup> y el área bajo el pico localizado alrededor de 1054 cm<sup>-1</sup>, que denotamos por I<sub>884/1054</sub>. Para las mezclas agua/etanol se realizó una grafica de I<sub>884/1054</sub> en función de la concentración de etanol, obteniéndose una relación lineal para concentraciones de 0.1% a 1 %. Un ajuste por mínimos cuadrados fue utilizado para obtener una relación lineal como curva de calibración de etanol, con un coeficiente de correlación de 0.97 (figura 5 (a)). De igual forma en el intervalo de 3 % a 20 % se obtiene una relación lineal de I<sub>884/1054</sub> en función de la concentración de etanol. La curva de calibración obtenida para este intervalo fue una relación lineal con un coeficiente de correlación igual a 0.92 (figura 5(b)). A partir de estas curvas de calibración se obtienen los porcentajes de etanol para las cuatro muestras estudiadas cuyos valores se resumen en la tabla 1. Como se puede observar estos valores son muy similares a los obtenidos por el método de cromatografía de gases.

## 4. Conclusiones.

A partir de diferentes muestras de pulque obtenidas de un proceso artesanal en el estado de Tlaxcala, México, se recuperó e identificó un consorcio microbiano formado por *Saccharomyces* sp, *Leucnonostoc* sp y *Zymomonas* sp. El cual es responsable de la fermentación ácida, alcohólica y viscosa del pulque. El producto obtenido tras 48 horas de fermentación a temperatura ambiente se caracterizó por tener 10.35 % de etanol, 4.75 g L<sup>-1</sup> de azúcares reductores y 1 g l<sup>-1</sup> de proteína. Con espectroscopia Raman se obtuvieron porcentajes de etanol muy similares a los obtenidos mediante cromatografía de gases, resultando ser un método directo y confiable para la cuantificación de la concentración de etanol en el pulque, en sus diferentes etapas de fermentación.

## Agradecimientos

Damos las gracias al señor Silvestre López por facilitarnos las muestras del pulque que elabora en San Simón Tlatlahuquitepec. A los auxiliares del departamento de Física del CINVESTAV, Ing. Marcela Guerrero e Ing. Ana Bertha Soto por su apoyo técnico y en especial a la M. en C. Alejandra García Sotelo por su valiosa ayuda en la caracterización Raman de las muestras. Por su apoyo agradecemos también a la Oficina de fomento a la investigación de la Pontificia Universidad Javeriana en Bogotá, Colombia y al departamento de Biotecnología del CINVESTAV. Este trabajo ha sido financiado por el Instituto Politécnico Nacional (México) mediante el proyecto CGPI: 20071721.

## Referencias

- [1] Ulloa, M. Herrera, T. An. Inst. Biol. UNAM. **47**, 145 (1976).
- [2] Escalante, A. Rodríguez, M. Martínez, A. López-Munguía, A. Bolivar, F. Gosset, G Fems Microbiol. Letters. **235**, 273 (2004).
- [3] Chellapandian, M., Larios, M., Sanchez-Gonzalez, C., Lopez, M. J. Ind. Microbiol Biotechnol. **21**, 51 (1988).
- [4] Doyle M. Microbiología de los Alimentos. Fundamentos y fronteras. Acribia, (Zaragoza, España, 1997).
- [5] Pedroza A.M., Matiz A., Quevedo B. (2003). Manual de laboratorio de Introducción a la Biotecnología. (Editorial CEJA. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, 2003).
- [6] Meza, R. A., Monroy, A. F., Mercado, M., Poutou, R. A., Rodríguez, P., Pedroza, A. M. *Universitas Scientiarum* **9**, 235-42 (2004).
- [7] Miller, G. *Analytical chemistry* **35**, 426 (1958).
- [8] Bradford, M.M. Ann. Biochem., **72**, 248 (1976).
- [9] Ríos E., Calva G. Aplicaciones de la cromatografía de gases y líquidos en Biotecnología. En Aspectos Aplicados de la Biotecnología. (Edi. Politécnico. ISBN 970-18-2172-6, 1999).
- [10] Tao, F., Miao, J.Y., Shi, G.Y. Zhang, K.C. (2005). Process Biochemistry **40**, 183 (2005).
- [11] Gallway, D. B., Ciolkowski, E. L., Dallinger, R. F., J. Chem. Educ., **69**, 79 (1992)